

F2



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 9/00, C07H 15/24, A61K 47/48		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/15573
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. April 1998 (16.04.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05190		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 22. September 1997 (22.09.97)		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(30) Prioritätsdaten: 196 40 969.1 4. Oktober 1996 (04.10.96) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LERCHEN, Hans-Georg [DE/DE]; Stürderstrasse 3, D-51375 Leverkusen (DE). VON DEM BRUCH, Karsten [DE/DE]; Bonifatiusstrasse 2, D-51375 Leverkusen (DE). BAUMGARTEN, Jörg [DE/DE]; Henselweg 13, D-42115 Wuppertal (DE). SPERZEL, Michael [DE/DE]; Normannenstrasse 31, D-42275 Wuppertal (DE).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).			
(54) Title: 20-O-LINKED CAMPTOTHECIN GLYCOCONJUGATES			
(54) Bezeichnung: 20-O-VERKNÜPFTE GLYCOKONJUGATE VON CAMPTOTHECIN			
(57) Abstract <p>The invention concerns camptothecin glycoconjugates in which at least one carbohydrate component is suitably linked to camptothecin via an oligopeptide bridge. The invention further concerns processes for preparing the compounds according to the invention and their use as medicaments, in particular in connection with cancers.</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft Glycokonjugate von Camptothecin, in denen mindestens eine Kohlenhydratkomponente in geeigneter Weise über eine Oligopeptid-Brücke mit Camptothecin verknüpft ist. Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen sowie deren Verwendung als Arzneimittel, insbesondere im Zusammenhang mit Krebserkrankungen.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

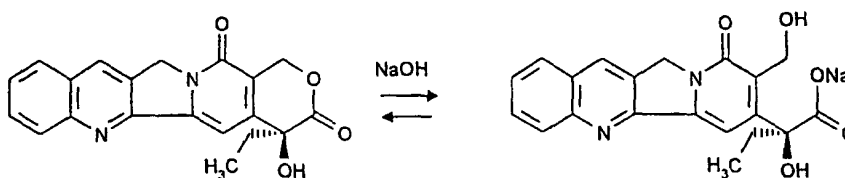
AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

20-O-verknüpfte Glykokonjugate von Camptothecin

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft Glykokonjugate von Camptothecin, in denen mindestens eine Kohlenhydratkomponente in geeigneter Weise über eine Oligopeptid-Brücke mit Camptothecin verknüpft ist.

Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen sowie deren Verwendung als Arzneimittel, insbesondere im Zusammenhang mit Krebserkrankungen.

- 10 20(S)-Camptothecin ist ein pentacyclisches Alkaloid, das 1966 von Wall et al. isoliert wurde (J.Am.Chem.Soc. 88, 3888 (1966)). Es besitzt ein hohes Antitumor-Wirkpotential in zahlreichen In-vitro- und In-vivo-Tests. Leider scheiterte jedoch die Realisierung des vielversprechenden Potentials in der Klinik an Toxizitäts- und Löslichkeitsproblemen.
- 15 Durch Öffnung des E-Ring-Lactons und Bildung des Natriumsalzes wurde eine wasserlösliche Verbindung erhalten, die in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit der ringgeschlossenen Form steht. Klinische Studien führten auch hier bisher nicht zum Erfolg.



- 20 Etwa 20 Jahre später wurde gefunden, daß die biologische Aktivität auf eine Enzyminhibition der Topoisomerase I zurückzuführen ist. Seither wurden die Forschungsaktivitäten wieder verstärkt, um verträglichere und in-vivo wirksame Camptothecin-Derivate zu finden.

- 25 Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit wurden Salze von A-Ring- und B-Ring-modifizierten Camptothecin-Derivaten sowie von 20-O-Acyl-Derivaten mit ionisierbaren Gruppen beschrieben (Vishnuvajjala et al. US 4 943 579). Letzteres Prodrug-Konzept wurde später auch auf modifizierte Camptothecin-Derivate übertragen (Wani et al. WO 9602546). Die beschriebenen 20-O-Acyl-Prodrugs haben

allerdings in-vivo eine sehr kurze Halbwertszeit und werden sehr schnell zum Grundkörper gespalten.

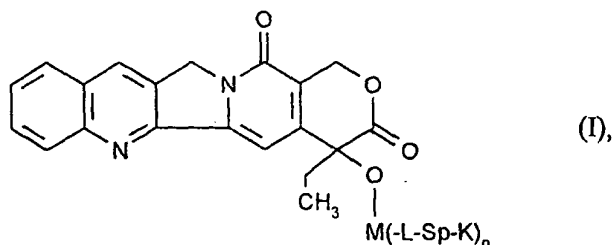
5 In unserer ebenfalls anhängigen Patentanmeldung PCT/96/01279 wird beschrieben, daß die Anknüpfung von Kohlenhydratresten über Aminosäure- oder Dipeptid-Spacer an Cytostatika, unter anderem an die 20-Hydroxyl-Gruppe von Camptothecin zu antineoplastisch hochwirksamen und darüber hinaus tumorselektiveren Verbindungen führt.

10 Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß durch eine Verlängerung des Peptidspacers mit geeigneten Aminosäuren die Wasserlöslichkeit der betreffenden Konjugate drastisch verbessert wird. Gleichzeitig zeigen diese Konjugate eine sehr gute biologische Aktivität.

Im einzelnen weisen die erfindungsgemäßen Camptothecin-Konjugate beispielsweise folgende günstige Eigenschaften auf:

- 15 - Durch die esterartige Anknüpfung der Carrier-Reste an die 20-Hydroxygruppe wird der für die Wirkung wichtige Lactonring der Camptothecin-Derivate stabilisiert.
- Die so erhaltenen Konjugate zeigen in-vitro eine hohe Aktivität gegenüber Tumorzelllinien und Tumoxenografts.
- Sie weisen gegenüber den zugrundeliegenden Toxophoren eine deutlich
20 höhere Verträglichkeit und Tumorselektivität auf.
- In-vivo zeigen sie exzellente therapeutische Wirksamkeit über mehrere Dosisstufen.
- Sie sind in extrazellulärem Medium und in Blut wesentlich stabiler als die zuvor beschriebenen 20-O-Acyl-Prodrugs von Camptothecin.

25 Die Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



worin

M für ein Peptid mit 3 bis 7 Aminosäurebausteinen steht, das über die α -Aminogruppe und/oder über Amino- und/oder Hydroxygruppen der Seitenketten mit 1 bis n' gleichen oder voneinander verschiedenen Gruppierungen

5

-L-Sp-K

verknüpft ist, wobei weitere funktionelle Gruppen des Peptids gegebenenfalls Schutzgruppen tragen können und

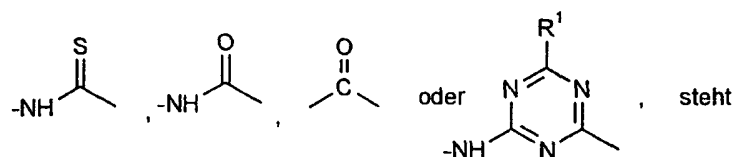
(-L-Sp-K)_n für n gleiche oder voneinander verschiedene Gruppierungen -L-Sp-K steht,

10

wobei

n eine Zahl von 1 bis n' bedeutet und n' der maximalen Anzahl möglicher Anknüpfungsstellen von M entspricht,

L für eine Gruppe der Formeln



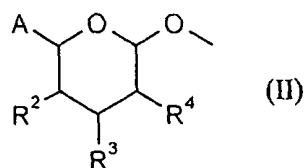
15

worin

R' Chlor oder Hydroxyalkylamino bedeutet,

Sp für Arylen mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen oder für Alkylen mit bis zu 8 Kohlenstoffatomen steht, die jeweils gegebenenfalls substituiert sind.

K für einen Rest der Formel (II)

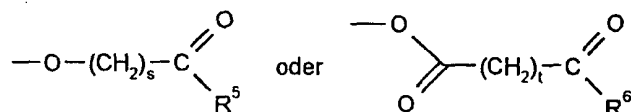


steht, worin

5 A Methyl, Hydroxymethyl, Alkoxymethyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Acyloxymethyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen oder einen Rest der Formel $-\text{CH}_2\text{-B}$ bedeutet, worin

B für einen Rest der Formel (II) steht,

10 R^2 , R^3 und R^4 unabhängig voneinander Wasserstoff, Hydroxy, gegebenenfalls durch Hydroxy substituiertes Alkoxy mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, gegebenenfalls durch Alkyl oder Acyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen substituiertes Amino, Halogen, Sulfat oder eine Gruppe der Formeln



bedeuten, worin

15 R^5 und R^6 unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen stehen oder für Amino, das gegebenenfalls durch Alkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen substituiert ist, stehen und

s und t unabhängig voneinander die Werte 0, 1, 2, 3 oder 4, insbesondere die Werte 1, 2, 3 oder 4 annehmen können

20 oder

R^2 , R^3 und R^4 unabhängig voneinander für einen Rest der Formel (II) stehen

oder

zwei der Reste R^2 , R^3 , R^4 zusammen für eine Epoxygruppe stehen,

sowie deren Isomere, Isomerengemische und Salze.

- 5 Die Bausteine L sind üblicherweise über ihre -NH-Funktion, sofern vorhanden, mit dem Bausteinen Sp verknüpft.

Der Begriff "Alkylgruppen" soll, sofern nicht anders angegeben, im Sinne der Erfindung geradkettige, verzweigte, cyclische und Cycloalkylreste enthaltende Alkylreste umfassen. Diese Definition soll sinngemäß auch für alle anderen Alkylgruppen enthaltenden Reste gelten, wie beispielsweise Alkoxy, Acyl usw.

- 10 Bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I), worin M für ein Peptid steht, das über Aminofunktionen mit den Resten L verknüpft ist, über eine Acylfunktion mit dem Camptothecin-Rest verknüpft ist und dessen Aminosäurebausteine gegebenenfalls Schutzgruppen tragen können. Besonders bevorzugt sind Tri-, Tetra- und Pentapeptide, insbesondere Tripeptide.

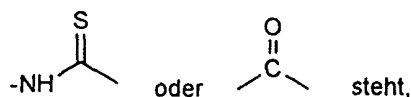
- 15 Die Aminosäurebausteine werden bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe Glycyl, Alanyl, Valyl, Leucyl, Lysyl, Seryl, Glutamyl, Threonyl, Asparagyl, Isoleucyl, Diaminopropionyl, Diaminobutyryl, Histidyl, Arginyl und/oder Ornithyl.

Besonders bevorzugt sind die Aminosäurebausteine Glycyl, Alanyl, Valyl, Leucyl, Lysyl, Seryl, Asparagyl, Histidyl und/oder Glutamyl.

- 20 Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel

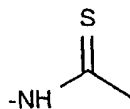
worin

L für eine Gruppe der Formel



sowie deren Isomeren, Isomerengemische und Salze.

Besonders bevorzugt steht L für



Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I), worin Sp für Arylen mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen steht, das gegebenenfalls noch ein- oder mehrfach durch Hydroxy, Carboxy, Carboxyalkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Nitro, Cyano, Halogen, Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Halogenalkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen oder durch Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen substituiert ist, sowie deren Isomere, Isomerengemische und Salze.

Besonders bevorzugt ist Sp abgesehen von K und L unsubstituiert oder gegebenenfalls ein- oder zweifach substituiert durch Halogen, Nitro, Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Alkoxy mit bis zu 2 Kohlenstoffatomen, $-\text{OCF}_3$ und/oder $-\text{CF}_3$.

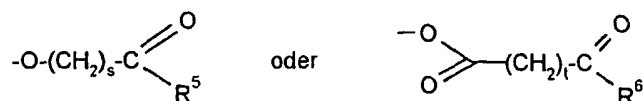
Ganz besonders bevorzugt ist Sp paraständig mit K und L verknüpft und trägt keine weiteren Substituenten.

Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I), worin K für einen Rest der Formel (II) steht,

wobei

A Methyl, Hydroxymethyl, Methoxymethyl oder Acetoxymethyl bedeutet,

R^2 Wasserstoff, Hydroxyl, Methoxy oder eine Gruppe der Formeln



bedeutet, worin

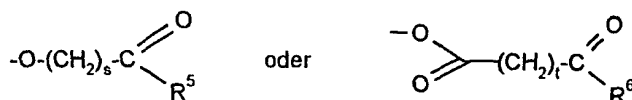
s und t unabhängig voneinander die Werte 1 oder 2 annehmen können und

R^5 und R^6 unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen stehen,

oder

R^2 für einen Rest der Formel (II) steht,

- 5 R^3 Wasserstoff, Hydroxyl, Halogen, Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Sulfat oder eine Gruppe der Formeln

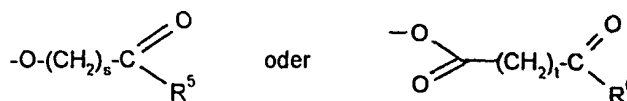


bedeutet, worin

s und t unabhängig voneinander die Werte 1 oder 2 annehmen können und

- 10 R^5 und R^6 unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen stehen oder für Amino, das gegebenenfalls durch Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen substituiert ist, stehen,

- 15 R^4 Hydroxyl, Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, das gegebenenfalls durch Hydroxy substituiert ist, Amino, das gegebenenfalls durch Alkyl oder Acyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen substituiert ist, oder eine Gruppe der Formeln



bedeutet, worin

s und t unabhängig voneinander die Werte 1 oder 2 annehmen können und

R^5 und R^6 unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen stehen,

oder worin

R^2 und R^3 gemeinsam für eine Epoxygruppe stehen,

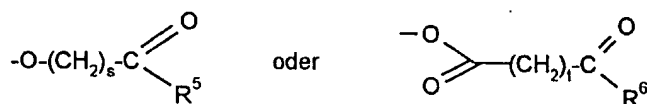
5 sowie deren Isomere, Isomerengemische und Salze.

Ganz besonders bevorzugt steht K für einen Rest der Formel (II), worin

A Methyl, Hydroxymethyl, Methoxymethyl oder Acetoxymethyl bedeutet,

R^2 und R^4 jeweils eine Hydroxygruppe bedeuten und

10 R^3 Wasserstoff, Hydroxyl, Halogen, Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Sulfat oder eine Gruppe der Formeln



bedeutet, worin

s und t unabhängig voneinander die Werte 1 oder 2 annehmen können und

15 R^5 und R^6 unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen stehen oder für Amino, das gegebenenfalls durch Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen substituiert ist, stehen.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfassen die Kohlenhydrat-Bausteine K jeweils maximal zwei Monosaccharid-Bausteine.

20 Durch Kombination der für die einzelnen Reste angegebenen bevorzugten oder besonders bevorzugten Bedeutungen ergeben sich entsprechend ganz besonders bevorzugte Verbindungen der allgemeinen Formel (I).

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in stereoisomeren Formen, beispielsweise als Enantiomere oder Diastereomere, oder als deren Gemische, beispielsweise als Racemat, vorliegen. Die Erfindung betrifft sowohl die reinen Stereoisomere als auch deren Gemische.

- 5 Stereoisomerengemische können, falls erforderlich, in bekannter Weise in die stereoisomer einheitlichen Bestandteile getrennt werden, beispielsweise durch Chromatographie oder durch Kristallisationsverfahren.

- 10 Die Stereochemie am anomeren Zentrum der Kohlenhydratbausteine K kann α oder β sein. Durch die Stereochemie an den anderen Zentren kann sich die gluco-, manno-, galacto-, gulo-, rhamno- oder fuco-Konfiguration ergeben.

Die Aminosäurebausteine können ebenso wie die Kohlenhydratbausteine jeweils in der D- oder in der L-Form vorliegen.

- 15 Der Camptothecin-Baustein Cp kann in der 20(R)- oder in der 20(S)-Konfiguration oder als Gemisch dieser beiden stereoisomeren Formen vorliegen. Bevorzugt ist die 20(S)-Konfiguration.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können bedingt durch eine Rotationshinderung in rotationsisomeren Formen oder als deren Gemisch auftreten. Die Erfindung betrifft sowohl die reinen Rotationsisomere als auch deren Gemische.

- 20 Rotationsisomerengemische können gegebenenfalls, falls erforderlich, mittels bekannter Methoden in die einheitlichen Bestandteile getrennt werden, beispielsweise durch Chromatographie (z.B. HPLC) oder durch Kristallisationsverfahren. Möglich ist dies nicht nur auf der Endstufe der Glycokongjugate, sondern gegebenenfalls auch auf Zwischenstufen. Aus den rotamerenreinen Zwischenstufen können gegebenenfalls durch geeignete Syntheseführung die rotamerenreinen Endstufen hergestellt werden.
- 25

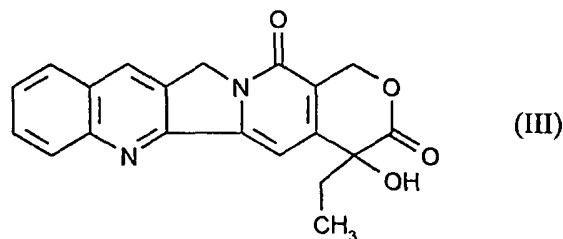
Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch in Form ihrer Salze vorliegen. Im allgemeinen seien hier Salze mit organischen oder anorganischen Basen oder Säuren sowie innere Salze genannt.

Zu den Säuren, die addiert werden können, gehören vorzugsweise Halogenwasserstoffsäuren, wie z.B. die Chlorwasserstoffsäure und die Bromwasserstoffsäure, insbesondere die Chlorwasserstoffsäure, ferner Phosphorsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure, mono- und bifunktionelle Carbonsäuren und Hydroxycarbonsäuren, wie
5 z.B. Essigsäure, Trifluoressigsäure, Maleinsäure, Malonsäure, Oxalsäure, Gluconsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Salizylsäure, Sorbinsäure und Milchsäure sowie Sulfonsäuren, wie z.B. p-Toluolsulfonsäure, 1,5-Naphthalindisulfonsäure oder Camphersulfonsäure.

10 Physiologisch unbedenkliche Salze können ebenso Metall- oder Ammoniumsalze der erfindungsgemäßen Verbindungen sein, welche eine freie Carboxylgruppe besitzen. Besonders bevorzugt sind z.B. Natrium-, Kalium-, Magnesium- oder Calciumsalze, sowie Ammoniumsalze, die abgeleitet sind von Ammoniak oder organischen Aminen wie beispielsweise Ethylamin, Di- bzw. Triethylamin, Di- bzw. Triethanolamin, Dicyclohexylamin, Dimethylaminoethanol, Arginin, Lysin,
15 Ethylendiamin oder Phenethylamin.

Die erfindungsgemäßen Glycokonjugate können beispielsweise hergestellt werden durch Verknüpfung von Camptothecin mit aktivierten Carboxylkomponenten, die ihrerseits beispielsweise Teile von geschützten Aminosäuren, Peptiden oder kohlenhydratmodifizierten Peptiden darstellen können.

20 Die Erfindung betrifft daher weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I), dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der Formel (III)



25 mit einer dem oben definierten Rest M entsprechenden aktivierten Carboxylkomponente Ma, die gegebenenfalls Schutzgruppen trägt, in einem geeigneten Lösungsmittel, gegebenenfalls in Gegenwart einer Base, nach üblichen Methoden umgesetzt, gegebenenfalls mittels bekannter Methoden selektiv eine, mehrere oder

alle Schutzgruppen von M abspaltet und das Produkt mit Verbindungen der allgemeinen Formel (IV)



worin

- 5 K und Sp wie oben definiert sind und La für eine reaktive Vorstufe der Gruppe L steht, umsetzt, wobei gegebenenfalls die Schutzgruppen selektiv abgespalten und schrittweise noch andere Gruppen der Formel K-Sp-L- in vergleichbarer Weise eingeführt werden können,

- 10 oder daß man in vergleichbarer Weise nach üblichen Methoden einen ersten Aminosäurerest in Form der entsprechenden gegebenenfalls Schutzgruppen tragenden aktivierten Carboxylkomponente einführt, gegebenenfalls Schutzgruppen abspaltet, weiterhin gegebenenfalls Schutzgruppen tragende Aminosäurereste entweder sukzessiv oder als Peptidbaustein anknüpft, gegebenenfalls Schutzgruppen abspaltet, wie oben angegeben Reste der Formel K-Sp-L einführt und
15 falls erforderlich Schutzgruppen abspaltet.

- Die Reaktionen können bei verschiedenen Druck- und Temperaturverhältnissen, beispielsweise 0,5 bis 2 bar, bzw. -30 bis +100°C, in geeigneten Lösungsmitteln wie Dimethylformamid (DMF), Tetrahydrofuran (THF), Dichlormethan, Chloroform, niederen Alkoholen, Acetonitril, Dioxan, Wasser oder in Gemischen der
20 genannten Lösungsmittel durchgeführt werden. In der Regel sind Reaktionen in DMF oder THF/ Dichlormethan bei Normaldruck und bei einer Temperatur von 0 bis 60°C, insbesondere bei Raumtemperatur, bevorzugt.

- Für die Aktivierung der Carboxylgruppen kommen die in der Peptidchemie bekannten Kupplungsreagenzien wie sie z.B. in Jakubke/Jeschkeit: Aminosäuren, Peptide, Proteine; Verlag Chemie 1982 oder Tetrahedr. Lett. 34, 6705 (1993) beschrieben sind, in Frage. Bevorzugt sind beispielsweise Säurechloride, N-Carbonsäureanhydride oder gemischte Anhydride.
25

- Weiterhin geeignet zur Aktivierung der Carboxylgruppen ist die Bildung von Addukten mit Carbodiimiden z.B. N,N'-Diethyl-, N,N'-Diisopropyl-, N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-Hydrochlorid,
30

- 5 N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat, oder Carbonylverbindungen wie Carbonyldiimidazol, oder 1,2-Oxazoliumverbindungen wie 2-Ethyl-5-phenyl-1,2-oxazolium-3-sulfat oder 2-tert-Butyl-5-methyl-isoxazolium-perchlorat, oder Acylaminoverbindungen wie 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin, oder Propanphosphonsäureanhydrid, oder Isobutylchloroform, oder Benzotriazolyloxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat, 1-Hydroxybenzotriazol oder N-Hydroxysuccinimid.

Als Basen können beispielsweise Triethylamin, Ethyl-diisopropylamin, Pyridin, N,N-Dimethylaminopyridin oder andere eingesetzt werden.

- 10 Als Schutzgruppen für eventuelle Drittfunktionen der Aminosäuren können die in der Peptidchemie bekannten Schutzgruppen beispielsweise vom Urethan-, Alkyl-, Acyl-, Ester- oder Amid-Typ eingesetzt werden.

Aminoschutzgruppen im Rahmen der Erfindung sind die üblichen in der Peptid-Chemie verwendeten Aminoschutzgruppen.

- 15 Hierzu gehören bevorzugt: Benzyloxycarbonyl, 3,4-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 3,5-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 2,4-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 4-Methoxybenzyloxycarbonyl, 4-Nitrobenzyloxycarbonyl, 2-Nitrobenzyloxycarbonyl, 2-Nitro-4,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl, Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, tert.-Butoxycarbonyl (Boc), Allyloxycarbonyl, Vinyloxycarbonyl, 3,4,5-Trimethoxybenzyloxycarbonyl, 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl, 2,2,2-Trichlor-tert-butoxycarbonyl, 20 Menthyloxycarbonyl, 4-Nitrophenoxycarbonyl, Fluorenyl-9-methoxycarbonyl (Fmoc), Formyl, Acetyl, Propionyl, Pivaloyl, 2-Chloracetyl, 2-Bromacetyl, 2,2,2-Trifluoracetyl, 2,2,2-Trichloracetyl, Benzoyl, Benzyl, 4-Chlorbenzoyl, 4-Brombenzoyl, 4-Nitrobenzoyl, Phthalimido, Isovaleroyl oder Benzyloxymethylen, 25 4-Nitrobenzyl, 2,4-Dinitrobenzyl, 4-Nitrophenyl oder 2-Nitrophenylsulfenyl. Besonders bevorzugt sind die Fmoc-Gruppe und die Boc-Gruppe.

Bevorzugte Carboxylschutzgruppen sind lineare oder verzweigte C₁-C₄-Alkylester.

- 30 Die Modifizierung von Aminosäure- oder Peptidkonjugaten von Camptothecin-Derivaten mit Kohlenhydratresten kann über verschiedene Methoden und Linkergruppen erfolgen. Bevorzugt ist z.B. die Überführung von p-Aminophenylglycosiden in Isothiocyanate und die Verknüpfung beispielsweise mit Aminogruppen.

Weiterhin können auch Carboxyalkyl- oder Aminoalkylglycoside leicht mit Amino- bzw. Carboxylgruppen gekuppelt werden. Denkbar ist ebenso die Herstellung von N- oder O-Glycopeptiden.

- 5 Die Abspaltung von Schutzgruppen in entsprechenden Reaktionsschritten kann zum Beispiel durch Säure- oder Base-Einwirkung, hydrogenolytisch oder auf andere Weise reaktiv erfolgen.

Biologische Testung**1. Wachstumsinhibitionstest zur Bestimmung der cytotoxischen Eigenschaften:**

Die humanen Dickdarmzelllinien SW 480 und HT 29 (ATCC-Nr. CCL 228 und HBT-38) sowie die Maus-Melanom-Zelllinie B16F10 wurden in Rouxschalen in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10 % FCS gezogen. Anschließend wurde trypsinisiert und in RPMI plus 10 % FCS zu einer Zellzahl von 50.000 Zellen/ml aufgenommen. 100 µl Zellsuspension/Well wurden in eine 96 Mikrowellplatte gegeben und 1 Tag bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden weitere 100 µl RPMI Medium und 1 µl DMSO mit den Prüfsubstanzen zugesetzt. Das Wachstum wurde nach Tag 3 und Tag 6 überprüft. Dazu wurde zu jedem Mikrowell 40 µl MTT-Lösung (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolinbromid) mit einer Ausgangskonzentration von 5 mg/ml H₂O zugesetzt. Es wurde 5 Stunden im CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und 100 µl i-Propanol/Well zugesetzt. Nach 30 min Schütteln mit 100 µl H₂O wurde die Extinktion bei 540 nm mit einem Titertek Multiskan MCC/340 (Flow) gemessen.

Die cytotoxische Wirkung ist in der Tabelle 1 als IC₅₀-Wert jeweils für die SW 480- und HT 29- und B16F10-Zelllinie angegeben:

Tabelle 1:

Beispiel	IC ₅₀ / µM SW 480	IC ₅₀ / µM HT 29	IC ₅₀ / µM B16F10
1.1	0,015	0,025	0,1
1.2	0,06	0,06	0,2

2. **Hämatopoetische Aktivität von Glykokonjugaten im Vergleich zum zugrundeliegenden Wirkstoff:**

Material und Methoden:

5 Knochenmarkzellen werden aus dem Femur der Maus gespült. 10^5 -Zellen werden in McCoy 5A-Medium (0,3 % Agar) zusammen mit rekombinanten murinen GM-CSF (Genzyme; Stammzellen-Kolonienbildung) und den Substanzen (10^{-4} bis 100 $\mu\text{g/ml}$) bei 37°C und 7 % CO_2 inkubiert. 7 Tage später werden die Kolonien (<50 Zellen) und Kluster (17-50 Zellen) ausgezählt.

10 **Ergebnisse:**

Wie in Tab. 2 dargestellt, zeigen die untersuchten Glykokonjugate gegenüber dem zugrundeliegenden Wirkstoff eine drastisch verminderte Hemmung der Knochenmarkstammzellproliferation.

Tabelle 2:

15 Hemmung der CSF-induzierten Proliferation von Knochenmarkstammzellen der Maus

Beispiel	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]
20(S)-Camptothecin	0,0004
1.1	0,03
1.2	0,28

20 3. **In-vivo-Hemmung des Tumorwachstums im Nacktmaus-Modell**

Material:

25 Für alle in-vivo-Experimente zur Untersuchung der Hemmung des Tumorwachstums wurden athymische Nacktmäuse (NMRI nu/nu-Stamm) verwendet. Das ausgewählte großzellige Lungenkarzinom LXFL 529 wurde durch serielle Passage in Nacktmäusen entwickelt. Der menschliche

Ursprung des Tumors wurde durch isoenzymatische und immunohistochemische Methoden belegt.

Experimenteller Aufbau:

5 Der Tumor wurde subcutan in beide Flanken von 6 bis 8 Wochen alten nu/nu-Nacktmäusen implantiert. Die Behandlung wurde, abhängig von der Verdopplungszeit, gestartet sobald die Tumoren einen Durchmesser von 5 - 7 mm erreicht hatten. Die Mäuse wurden der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe (5 Mäuse pro Gruppe mit 8 - 10 auswertbaren Tumoren) durch Randomisieren zugeteilt. Die einzelnen Tumoren der Kontrollgruppe wuchsen alle progressiv.

10 Die Größe der Tumoren wurde in zwei Dimensionen mittels Schieblehre vermessen. Das Tumolvolumen, das gut mit der Zellzahl korreliert, wurde anschließend für alle Auswertungen verwendet. Das Volumen wurde gemäß der Formel "Länge x Breite x Breite / 2" berechnet ($[a \times b^2] / 2$, a bzw. b stehen für zwei rechtwinklig angeordnete Durchmesser).

Die Werte des relativen Tumolvolumens (RTV) wurden für jeden einzelnen Tumor durch Dividieren der Tumorgroße am Tag X mit der Tumorgroße des Tages 0 (zum Zeitpunkt der Randomisierung) berechnet. Die mittleren Werte des RTV wurden dann für die weitere Auswertung verwendet.

20 Die Hemmung der Zunahme des Tumolvolumens (Tumolvolumen der Testgruppe/ Kontrollgruppe, T/C, in Prozent) war der abschließende Meßwert.

Behandlung:

Die Applikation der Verbindungen erfolgte an Tag 1, 2 und 3 nach Randomisierung intravenös (i.v.).

25 **Ergebnisse:**

Anhand der Verbindungen 1.1 und 1.2 ist die therapeutische Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Glycokonjugate gegenüber dem großzelligen humanen Lungentumorenografts LXFL 529 bei i.v.-Applikation dargestellt. Die Therapie führt bei der maximal tolerablen Dosis (MTD) und bei 1/2 MTD zu Tumorremissionen bzw. deutlichen Hemmungen des Tumorwachstums.

Tabelle 3:

Therapie	Dosis [mg/kg/Tag]	Überlebens- zeit [Tage]	Zahl der Tumoren	relatives Tumervolumen an Tag 14 [% des Tages 0]	relatives Körpergewicht an Tag 7 [% des Tages 0]
Kontroll- gruppe	-	>21 >21 >21 >21 15	9	533	102
1.1	12,5	>21 >21 1 >21 3	6	62	100
1.1	6,25	>21 >21 >21 >21 >21	9	83	102
1.2	12,5 (MTD)	>21 >21 1 >21 >21	7	41	101
1.2	6,25	>21 >21 >21 >21 >21	9	190	107

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen sowohl in-vitro als auch in-vivo eine überraschend starke cytotoxische Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Tumoren, insbesondere solchen der Lunge und des Dickdarms, verbunden mit einer großen Selektivität gegenüber nicht malignen Zellen auf.

Sie eignen sich daher zur Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere von solchen der Lunge und des Dickdarms.

Zur vorliegenden Erfindung gehören pharmazeutische Zubereitungen, die neben nicht-toxischen, inerten pharmazeutisch geeigneten Trägerstoffen eine oder mehrere erfindungsgemäße Verbindungen enthalten oder die aus einem oder mehreren erfindungsgemäßen Wirkstoffen bestehen, sowie Verfahren zur Herstellung dieser Zubereitungen.

Der oder die Wirkstoffe können gegebenenfalls in einem oder mehreren der oben angegebenen Trägerstoffe auch in mikroverkapselter Form vorliegen.

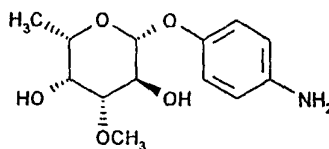
Die therapeutisch wirksamen Verbindungen sollen in den oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0,1 bis 99,5, vorzugsweise von etwa 0,5 bis 95 Gew.-%, der Gesamtmischung vorhanden sein.

Die oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen können außer den erfindungsgemäßen Verbindungen auch weitere pharmazeutische Wirkstoffe enthalten.

Im allgemeinen hat es sich sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin als vorteilhaft erwiesen, den oder die erfindungsgemäßen Wirkstoffe in Gesamtmengen von etwa 0,5 bis etwa 500, vorzugsweise 5 bis 100 mg/kg Körpergewicht je 24 Stunden, gegebenenfalls in Form mehrerer Einzelgaben, zur Erzielung der gewünschten Ergebnisse zu verabreichen. Eine Einzelgabe enthält den oder die erfindungsgemäßen Wirkstoffe vorzugsweise in Mengen von etwa 1 bis etwa 80, insbesondere 3 bis 30mg/kg Körpergewicht.

Beispiele:**Kohlenhydrat-Edukte****Beispiel I.1:****p-Aminophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid**

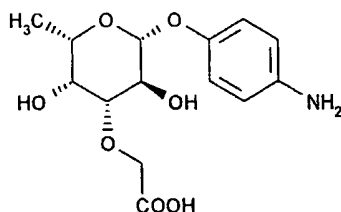
5

**I.1.a) p-Nitrophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid:**

6 g (21 mmol) p-Nitrophenyl-β-L-fucopyranosid in 300 ml absol. Methanol werden mit 7,84 g (31,5 mmol) Dibutylzinnoxid versetzt und 2 h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wird eingeeengt, der Rückstand getrocknet und dann in 10 300 ml DMF aufgenommen. Nach Zugabe von 15,7 ml Methyljodid wird der Ansatz 40 h bei 70°C gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in 300 ml Dichlormethan aufgenommen. Die Suspension wird filtriert, die verbleibende Lösung erneut eingeeengt und einer Flash-Chromatographie (Dichlormethan/Methanol 99:1) unterzogen. Nach Einengen erhält man 3,82 g 15 (61%) des Zielproduktes.

I.1) p-Aminophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid:

3,81 g (12,73 mmol) p-Nitrophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid werden in Methanol gelöst und nach Zusatz von Platindioxid in einer Wasserstoffatmosphäre bei geringem Überdruck hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Fällung mit Ether erhält man 3 g (88%) des Zielprodukts. [DC: Dichlormethan/Methanol 20 9:1 $R_f = 0,53$].

Beispiel 1.2:**p-Aminophenyl-3-O-carboxymethyl-β-L-fucopyranosid****I.2.a) p-Nitrophenyl-3-O-methoxycarbonylmethyl-β-L-fucopyranosid:**

- 5 1 g (3,5 mmol) p-Nitrophenyl-β-L-fucopyranosid und 1,3 g (5,2 mmol) Dibutylzinnoxid werden in 50 ml Methanol 2 h unter Rückfluß erhitzt. Die Lösung wird eingeeengt, der Rückstand in 50 ml Dioxan aufgenommen, mit 2 ml Bromessigsäure-methylester sowie 100 mg Tetrabutylammoniumiodid versetzt und 16 h unter Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wird abgedampft und das Produkt durch
- 10 Flash-Chromatographie (Dichlormethan/Methanol 99:1) gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Fällen aus Methanol/Ether erhält man 455 mg (37%) der Zielverbindung.

I.2) p-Aminophenyl-3-O-carboxymethyl-β-L-fucopyranosid:

- 282 mg (0,79 mmol) p-Nitrophenyl-3-methoxycarbonylmethyl-β-L-fucopyranosid
- 15 werden in 20 ml Methanol gelöst und mit 440 µl einer wäßrigen 2N Lithiumhydroxid-Lösung versetzt. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wird mit saurem Ionenaustauscher SC108 auf pH 3 eingestellt und filtriert. Zum Filtrat werden 250 mg Palladium auf Aktivkohle zugesetzt. Anschließend wird 1,5 h mit Wasserstoff bei geringem Überdruck hydriert, der Katalysator abgetrennt und mit
- 20 Methanol gewaschen. Einengen, Aufnehmen in Wasser und Gefriertrocknung führen in 86%iger Ausbeute zum Zielprodukt (212 mg). [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 $R_f = 0,24$]

Als weitere Kohlenhydratbausteine können beispielsweise die folgenden Derivate eingesetzt werden:

- 25 p-Aminophenyl-β-L-fucopyranosid
 p-Aminophenyl-2-O-methyl-β-L-fucopyranosid
 p-Aminophenyl-2-O-hydroxyethyl-β-L-fucopyranosid
 p-Aminophenyl-4-O-methyl-β-L-fucopyranosid
 p-Aminophenyl-3-O-methyl-α-L-fucopyranosid

- p-Aminophenyl-3-O-n-propyl- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-3-desoxy- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-3,4-didesoxy- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-3,4-epoxy- β -L-fucopyranosid
5 p-Aminophenyl-4-desoxy- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-methoxycarbonylmethyl- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-hydroxyethyl- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-2-O-carboxymethyl- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-succinyl- β -L-fucopyranosid
10 p-Aminophenyl-3,4-di-O-methyl- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-carbamoylmethyl- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl- α -L-rhamnopyranosid
p-Aminophenyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-2-O-methyl- β -D-galactopyranosid
15 p-Aminophenyl-3-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-4-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-6-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-2,3-di-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-2,4-di-O-methyl- β -D-galactopyranosid
20 p-Aminophenyl-2,6-di-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-3,4-di-O-methyl- β -D-galactopyranosid, Acetat
p-Aminophenyl-3,6-di-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-4,6-di-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-2,3,4-tri-O-methyl- β -D-galactopyranosid
25 p-Aminophenyl-2,3,6-tri-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-2,4,6-tri-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-3,4,6-tri-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-3-desoxy- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-3,4-didesoxy- β -D-galactopyranosid
30 p-Aminophenyl-6-O-acetyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-methoxycarbonylmethyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-carboxymethyl- β -D-galactopyranosid, Natriumsalz
p-Aminophenyl-3-O-carbamoylmethyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-(N-methyl-carbamoylmethyl)- β -D-galactopyranosid
35 p-Aminophenyl- α -D-mannopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-methyl- α -D-mannopyranosid
p-Aminophenyl-2,3-di-O-methyl- α -D-mannopyranosid

- p-Aminophenyl-3-O-methoxycarbonylmethyl- α -D-mannopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-carboxymethyl- α -D-mannopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-carbamoylmethyl- α -D-mannopyranosid
p-Aminophenyl-4-O-(β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid
5 p-Aminophenyl-4-O-(3'-sulfat- β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid,
Natriumsalz
p-Aminophenyl-4-O-(3'-O-methyl- β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid
p-Aminophenyl-2-O-methyl-4-O-(3'-O-methyl- β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid
10 p-Aminophenyl-4-O-(3',4'-di-O-methyl- β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid

Bereits in EP 501 250 wurde die Synthese der folgenden Kohlenhydratbausteine beschrieben:

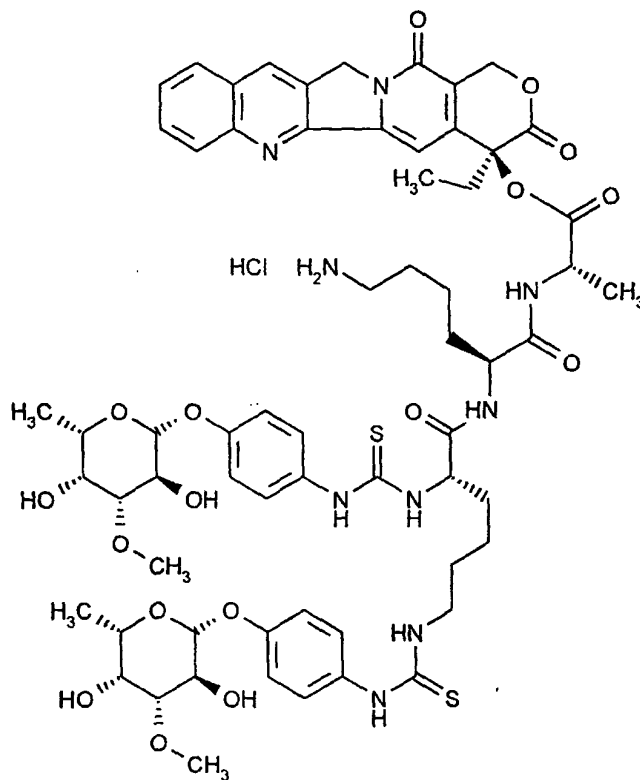
Carboxymethyl- β -L-fucopyranosid
5-Carboxypentyl- β -L-fucopyranosid

- 15 Die Verknüpfung dieser beiden Bausteine mit Peptidkonjugaten kann in der in EP 501 250 beschriebenen Weise erfolgen.

GlycokonjugateBeispiel 1.1:

20(S)-20-O-{N^α,N^ε-bis-[O-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenyl-amino-thiocarbonyl]-lysyl-lysyl-alanyl}-camptothecin, Hydrochlorid

5



1.1.a) 20(S)-20-O-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-alanyl]-camptothecin:

Eine Lösung von 5 g (14,4 mmol) 20(S)-Camptothecin in 200 ml absolutem Dimethylformamid wird unter Rühren mit 7,27 g (36 mmol) N-(tert-Butoxycarbonyl)-alanin-N-carbonsäureanhydrid sowie 500 mg (12 mmol) 4-(N,N-Dimethylamino)-pyridin versetzt. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur setzt man weitere 6,18 g (28,8 mmol) N-(tert-Butoxycarbonyl)-alanin-N-carbonsäureanhydrid und 500 mg (12 mmol) 4-(N,N-Dimethylamino)-pyridin zu und läßt den Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur im Ultraschallbad reagieren. Anschließend wird im Vakuum eingeeengt und der Rückstand durch Flashchromatographie [Petrol-
ether/Ethylacetat 1:1] gereinigt. Man erhält 4,7 g 63 % des Zielprodukts.

1.1.b) 20(S)-20-O-Alanyl-camptothecin, Trifluoracetat:

Eine Lösung von Verbindung 1.1.a (4,41 g, 8.5 mmol) in einer Mischung aus 290 ml Dichlormethan und 50 ml wasserfreier Trifluoressigsäure wird für 30 min. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen im Vakuum wird das Produkt aus Dichlormethan/Methanol mit Diethylether ausgefällt und gründlich mit Diethylether gewaschen. Ausb.: 4,2 g (93 %); [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 $R_f = 0,33$].

1.1.c) 20(S)-20-O-[N $^{\alpha}$ -(tert-Butoxycarbonyl)-N $^{\epsilon}$ -(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-alanyl]-camptothecin:

3,688 g (7,87 mmol) N $^{\alpha}$ -(tert-Butoxycarbonyl)-N $^{\epsilon}$ -(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-alanin und 1,595 g 1-Hydroxy-1H-benzotriazol Hydrat werden in 250 ml Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe von 1,81 g N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid rührt man für 30 min. bei Raumtemperatur. Anschließend setzt man eine Lösung aus Verbindung 1.1.b (3,5 g, 6,56 mmol) in 35 ml Dimethylformamid und 2,25 ml Ethyl-diisopropylamin zu und rührt den Ansatz für weitere 2h bei Raumtemperatur. Nach Einengen im Vakuum und Reinigung durch Flashchromatographie [Petrolether/ Ethylacetat 2:1 -> Ethylacetat] erhält man 5,212 g (91 %) der Zielverbindung [DC: Acetonitril $R_f = 0,65$].

1.1.d) 20(S)-20-O-[N $^{\epsilon}$ -(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-alanyl]-camptothecin, Trifluoracetat:

Eine Suspension der obigen Verbindung (5,21 g, 5,99 mmol) in Dichlormethan (300 ml) wird mit wasserfreier Trifluoressigsäure (50 ml) versetzt und die resultierende Lösung für 30 min. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen im Vakuum wird das Produkt mit Methanol rückdestilliert und anschließend aus Dichlor-

methan durch Zugabe von Diethylether ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert. (4,8 g, 90%) [DC: Acetonitril/Wasser 20:1 R_f = 0,1]

1.1.e) 20(S)-20-O-{{N^α,N^ε-bis-tert-Butoxycarbonyl-lysyl}-[N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]-alanyl}-camptothecin

- 5 141 mg (0,41 mmol) N^α,N^ε-bis-tert-Butoxycarbonyl-lysin und 83 mg 1-Hydroxy-1H-benzotriazol Hydrat werden in 20 ml Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe von 94 mg N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid rührt man für 1h bei Raumtemperatur. Anschließend setzt man eine Lösung aus Verbindung
- 10 1.1.d (300 mg, 0,34 mmol) in 3 ml Dimethylformamid und 58 µl Ethyl-diisopropylamin zu und rührt den Ansatz für weitere 30 min. bei Raumtemperatur. Nach Einengen im Vakuum wird der Rückstand mit Wasser digeriert und abgesaugt. Das Produkt wird in DMF aufgenommen und mit Diethylether gefällt. Man erhält 338 mg (91 %) der Zielverbindung [DC: Acetonitril/Wasser 10:1 R_f = 0,65].

- 15 **1.1.f) 20(S)-20-O-{Lysyl-[N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl]-alanyl}-camptothecin, Bis-Trifluoracetat:**

Bei 336 mg (0,306 mmol) der Verbindung 1.1.e werden mit 5 ml Trifluoressigsäure in 30 ml Dichlormethan in Analogie zu Beispiel 1.1.d die Boc-Schutzgruppen entfernt. Ausb.: 338 mg (98%)

- 20 **1.1.g) 20(S)-20-O-{N^α,N^ε-bis-[O-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxyphenylamino-thiocarbonyl]-lysyl-N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-lysyl-alanyl}-camptothecin**

- Eine Lösung von 104 mg (0,368 mmol) p-Aminophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid (Beispiel 1.1) in Dioxan/Wasser 2:1 (15 ml) wird unter Rühren mit Thiophosgen (59 µl, 0,77 mmol) versetzt. Nach 10 min. versetzt man mit 3 Äquivalenten Ethyl-diisopropylamin, engt anschließend im Vakuum ein und trocknet den Rückstand für 1h im Ölpumpenvakuum. Das erhaltene Isothiocyanat wird in 50 ml absolutem Dimethylformamid gelöst und mit 337 g (0,3 mmol) von Verbindung 1.1.f sowie 205 µl Ethyl-diisopropylamin versetzt. Man rührt für 16 h bei Raumtemperatur, engt dann im Vakuum ein und reinigt durch Flash-Chromatographie [Acetonitril/Wasser 50:1]. Man erhält 247 mg (54%) des Zielproduktes. [DC: Acetonitril/Wasser 10:1 R_f = 0,46].
- 25
- 30

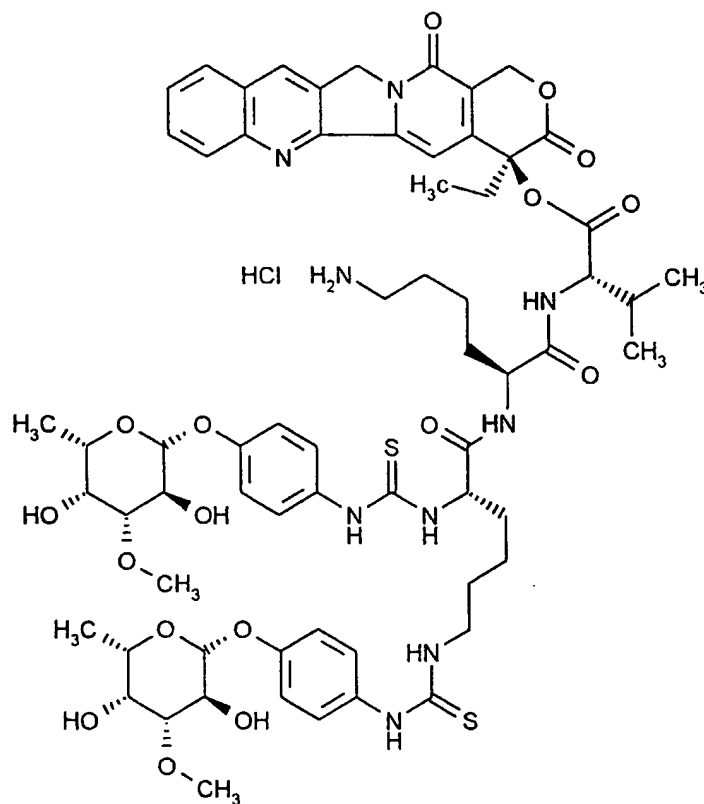
1.1) 20(S)-20-O-{N^α,N^ε-bis-[O-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-lysyl-lysyl-alanyl}-camptothecin, Hydrochlorid

245 mg (0,161mmol) der Verbindung 1.1.g werden mit 0,5 ml Piperidin in 10 ml DMF 30 min bei Raumtemperatur umgesetzt. Man engt ein, digeriert den Rückstand mit Dichlormethan und destilliert das Lösungsmittel nochmals im Vakuum ab. Man nimmt den Rückstand erneut in Dichlormethan/Methanol auf und fällt das Produkt mit Diethylether aus. Man erhält 185 mg (88%) der aminodeblockierten Verbindung. [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 R_F=0,24]. Diese wird in Wasser suspendiert und mit einem Äquivalent einer 0,1N HCl-Lösung in das Hydrochlorid überführt. Aus der wäßrigen Lösung wird durch Gefriertrocknung die Zielverbindung erhalten.

Beispiel 1.2:

20(S)-20-O-{N^α,N^ε-bis-[O-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-lysyl-lysyl-valinyl}-camptothecin, Hydrochlorid

15

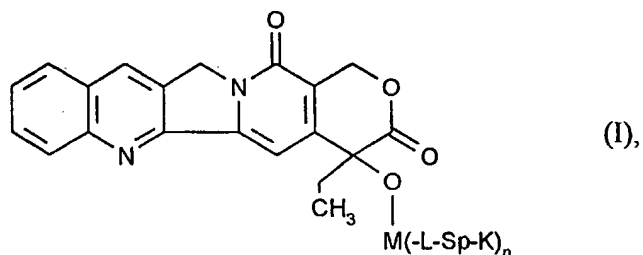


Die Synthese dieser Verbindung erfolgt völlig analog zur oben beschriebenen Synthese der Verbindung 1.1. Lediglich im ersten Reaktionsschritt wird an Stelle von

N-(tert-Butoxycarbonyl)-alanin-N-carbonsäureanhydrid N-(tert-Butoxycarbonyl)-valin-N-carbonsäureanhydrid mit 20-(S)-Camptothecin umgesetzt. R_f der Zielverbindung: 0,25 [Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2]

Patentansprüche

1. Verbindungen der Formel (I)



worin

- 5 M für ein Peptid mit 3 bis 7 Aminosäurebausteinen steht, das über die α -Aminogruppe und/oder über Amino- und/oder Hydroxygruppen der Seitenketten mit 1 bis n' gleichen oder voneinander verschiedenen Gruppierungen

-L-Sp-K

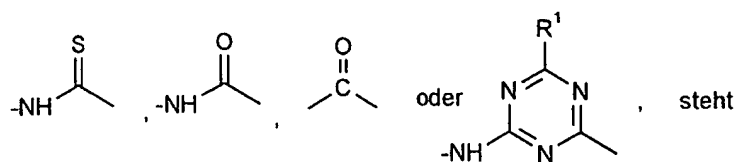
- 10 verknüpft ist, wobei weitere funktionelle Gruppen des Peptids gegebenenfalls Schutzgruppen tragen können und

(-L-Sp-K)_n für n gleiche oder voneinander verschiedene Gruppierungen
-L-Sp-K steht,

wobei

- 15 n eine Zahl von 1 bis n' bedeutet und n' der maximalen Anzahl möglicher Anknüpfungsstellen von M entspricht,

L für eine Gruppe der Formeln

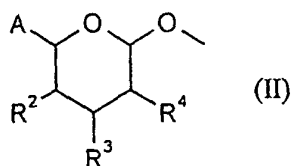


worin

R^1 Chlor oder Hydroxyalkylamino bedeutet,

Sp für Arylen mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen oder für Alkylen mit bis zu 8 Kohlenstoffatomen steht, die jeweils gegebenenfalls substituiert sind.

K für einen Rest der Formel (II)

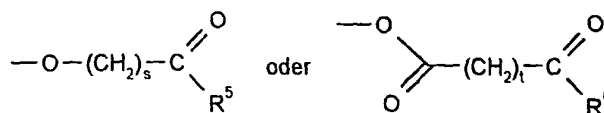


steht, worin

A Methyl, Hydroxymethyl, Alkoxymethyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Acyloxymethyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen oder einen Rest der Formel $-CH_2-B$ bedeutet, worin

B für einen Rest der Formel (II) steht,

R^2 , R^3 und R^4 unabhängig voneinander Wasserstoff, Hydroxy, gegebenenfalls durch Hydroxy substituiertes Alkoxy mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, gegebenenfalls durch Alkyl oder Acyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen substituiertes Amino, Halogen, Sulfat oder eine Gruppe der Formeln



bedeuten, worin

R^5 und R^6 unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen stehen oder

für Amino, das gegebenenfalls durch Alkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen substituiert ist, stehen und

s und t unabhängig voneinander die Werte 0, 1, 2, 3 oder 4 annehmen können

5 oder

R^2 , R^3 und R^4 unabhängig voneinander für einen Rest der Formel (II) stehen

oder

zwei der Reste R^2 , R^3 , R^4 zusammen für eine Epoxygruppe stehen,

10 sowie deren Isomere, Isomerengemische und Salze.

2. Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, worin M für ein Peptid steht, das über Aminofunktionen mit den Resten L verknüpft ist, über eine Acylfunktion mit dem Camptothecin-Rest verknüpft ist und dessen Aminosäurebausteine gegebenenfalls Schutzgruppen tragen können,

15 sowie deren Isomeren, Isomerengemische und Salze.

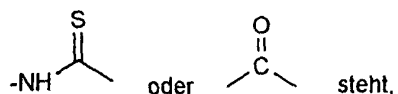
3. Verbindungen gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Tri-, Tetra- oder Pentapeptide handelt.

4. Verbindungen gemäß Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäurebausteine des Peptids ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Glycyl, Alanyl, Valyl, Leucyl, Lysyl, Seryl, Glutamyl, Threonyl, Asparagyl, Isoleucyl, Diaminopropionyl, Diaminobutyryl, Histidyl, Arginyl und/oder Ornithyl.
- 20

5. Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1,

worin

L für eine Gruppe der Formel



sowie deren Isomeren, Isomerengemische und Salze.

6. Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1,

5 worin

Sp für Arylen mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen steht, das gegebenenfalls noch ein- oder mehrfach durch Hydroxy, Carboxy, Carboxyalkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Nitro, Cyano, Halogen, Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Halogenalkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen oder durch Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen substituiert ist,

10

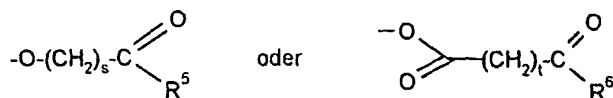
sowie deren Isomere, Isomerengemische und Salze.

7. Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, worin K für einen Rest der Formel (II) steht,

15 wobei

A Methyl, Hydroxymethyl, Methoxymethyl oder Acetoxymethyl bedeutet,

R² Wasserstoff, Hydroxyl, Methoxy oder eine Gruppe der Formeln



20 bedeutet, worin

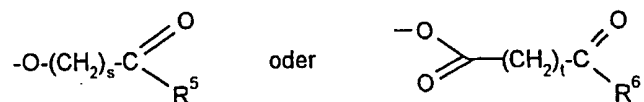
s und t unabhängig voneinander die Werte 1 oder 2 annehmen können und

R^5 und R^6 unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen stehen,

oder

R^2 für einen Rest der Formel (II) steht,

5 R^3 Wasserstoff, Hydroxyl, Halogen, Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Sulfat oder eine Gruppe der Formeln

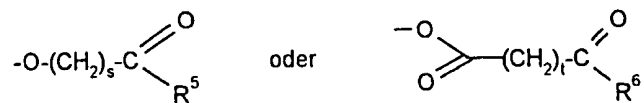


bedeutet, worin

10 s und t unabhängig voneinander die Werte 1 oder 2 annehmen können und

R^5 und R^6 unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen stehen oder für Amino, das gegebenenfalls durch Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen substituiert ist, stehen,

15 R^4 Hydroxyl, Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, das gegebenenfalls durch Hydroxy substituiert ist, Amino, das gegebenenfalls durch Alkyl oder Acyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen substituiert ist, oder eine Gruppe der Formeln



20 bedeutet, worin

s und t unabhängig voneinander die Werte 1 oder 2 annehmen können und

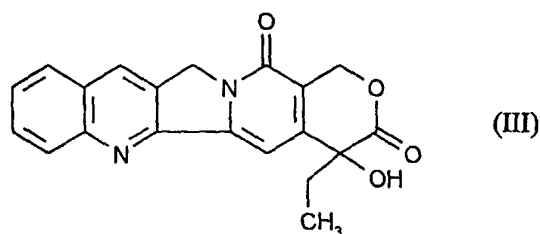
R^5 und R^6 unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen stehen,

oder worin

R^2 und R^3 gemeinsam für eine Epoxygruppe stehen,

5 sowie deren Isomere, Isomerengemische und Salze.

8. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der Formel (III)



- 10 mit einer dem oben definierten Rest M entsprechenden aktivierten Carboxylkomponente Ma, die gegebenenfalls Schutzgruppen trägt, in einem geeigneten Lösungsmittel, gegebenenfalls in Gegenwart einer Base, nach üblichen Methoden umgesetzt, gegebenenfalls mittels bekannter Methoden selektiv eine, mehrere oder alle Schutzgruppen von M abspaltet und das
- 15 Produkt mit Verbindungen der allgemeinen Formel (IV)

K-Sp-La (IV),

worin

- K und Sp wie oben definiert sind und La für eine reaktive Vorstufe der Gruppe L steht, umgesetzt, wobei gegebenenfalls die Schutzgruppen selektiv abgespalten und schrittweise noch andere Gruppen der
- 20 Formel K-Sp-L- in vergleichbarer Weise eingeführt werden können,

oder daß man in vergleichbarer Weise nach üblichen Methoden einen ersten Aminosäurerest in Form der entsprechenden gegebenenfalls Schutz-

5 gruppen tragenden aktivierten Carboxylkomponente einführt, gegebenenfalls Schutzgruppen abspaltet, weiterhin gegebenenfalls Schutzgruppen tragende Aminosäurereste entweder sukzessiv oder als Peptidbaustein anknüpft, gegebenenfalls Schutzgruppen abspaltet, wie oben angegeben
Reste der Formel K-Sp-L, einführt und falls erforderlich Schutzgruppen abspaltet,

und daß man gegebenenfalls die Stereoisomere nach üblichen Methoden trennt und gegebenenfalls die Verbindungen in ihre Salze überführt.

- 10 9. Verwendung von Verbindungen der Formel (I) gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Arzneimitteln.
10. Arzneimittel enthaltend eine oder mehrere Verbindungen der Formel (I) gemäß Anspruch 1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 97/05190

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6: C07K 9/00, C07H 15/24, A61K 47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6: C07K, C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REG. CAPLUS, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	W0 9626950 A1 (PHARMACIA S.P.A.), 6 September 1996 (06.09.96), see example 11-13	1-10
X	W0 9510304 A1 (PHARMACIA S.P.A.), 20 April 1995 (20.04.95)	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 January 1998 (22.01.98)

Date of mailing of the international search report

11 February 1998 (11.02.98)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

SA 74877

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

07/01/98

International application No.

PCT/EP 97/05190

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9626950 A1	06/09/96	AU 4869896 A	18/09/96
		CA 2189358 A	06/09/96
		EP 0758339 A	19/02/97
		FI 964331 A	01/11/96
		GB 9504065 D	00/00/00
		HU 9603305 A	28/08/97
		IL 117193 D	00/00/00
		NO 964610 A	31/10/96
		PL 317094 A	17/03/97
WO 9510304 A1	20/04/95	AU 679788 B	10/07/97
		AU 7783694 A	04/05/95
		CA 2150132 A	20/04/95
		CN 1115564 A	24/01/96
		EP 0673258 A	27/09/95
		FI 952746 A	05/06/95
		HU 71678 A	29/01/96
		HU 9502084 D	00/00/00
		IL 111173 D	00/00/00
		JP 8504217 T	07/05/96
		NZ 273952 A	28/10/96
		PL 309328 A	02/10/95
		ZA 9407823 A	03/07/95

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05190

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPC6: C07K 9/00, C07H 15/24, A61K 47/48
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPC6: C07K, C07H

Recherche, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

REG. CAPLUS, WPI

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 9626950 A1 (PHARMACIA S.P.A.), 6 September 1996 (06.09.96), siehe beispiel 11-13 ---	1-10
X	WO 9510304 A1 (PHARMACIA S.P.A.), 20 April 1995 (20.04.95) -----	1-10

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen.

☒ Siehe Anhang Patentfamilie.

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Besetzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22 Januar 1998

Abrendedatum des internationalen Recherchenberichts

11.02.98

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Carolina Gómez Lagerlöf

SA /4877

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören
07/01/98

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05190

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9626950 A1	06/09/96	AU 4869896 A	18/09/96
		CA 2189358 A	06/09/96
		EP 0758339 A	19/02/97
		FI 964331 A	01/11/96
		GB 9504065 D	00/00/00
		HU 9603305 A	28/08/97
		IL 117193 D	00/00/00
		NO 964610 A	31/10/96
		PL 317094 A	17/03/97
WO 9510304 A1	20/04/95	AU 679788 B	10/07/97
		AU 7783694 A	04/05/95
		CA 2150132 A	20/04/95
		CN 1115564 A	24/01/96
		EP 0673258 A	27/09/95
		FI 952746 A	05/06/95
		HU 71678 A	29/01/96
		HU 9502084 D	00/00/00
		IL 111173 D	00/00/00
		JP 8504217 T	07/05/96
		NZ 273952 A	28/10/96
		PL 309328 A	02/10/95
		ZA 9407823 A	03/07/95